

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Martina Matanović

**DISTRIBUCIJA INZULINSKOG
RECEPTORA U HIPOKAMPUSU
GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA
*B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Martina Matanović

**DISTRIBUCIJA INZULINSKOG
RECEPTORA U HIPOKAMPUSU
GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA
*B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc.dr.sc. Barbara Viljeić

Rad ima 26 stranica, 1 tablicu i 8 slika.

Prije svega, velika hvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Barbari Viljetić, na svim savjetima, prenesenom znanju i ogromnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Zahvalu upućujem i Ivani Mance i Barbari Stapić za stručnu pomoć.

Hvala mojim kolegama i prijateljima Tei, Mateu, Sari, Jeleni i Karli na strpljenju i pomoći.

Osobito hvala Antoniji za podršku i ohrabrivanje.

Posebnu zahvalu upućujem Marku i mojoj obitelji za bezgranično strpljenje, podršku, brigu i svaku pomoć.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hipokampus.....	1
1.2. Insulin	1
1.2.1. Insulinski receptor	3
1.3. Stanična membrana i lipidne splavi.....	4
1.4. Gangliozidi	5
1.4.1. Sinteza i razgradnja gangliozida	6
2. HIPOTEZA	7
3. CILJEVI	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1. Materijali	9
4.2. Kemikalije	9
4.3. Metode	10
4.3.1. Genotipizacija	10
4.3.2. Žrtvovanje životinja	10
4.3.3. Imunohistokemija	11
4.3.4. Analiza izražaja IR- α	11
5. REZULTATI.....	12
6. RASPRAVA.....	18
7. ZAKLJUČCI	20
8. SAŽETAK.....	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS	26

POPIS KRATICA

CA1 i CA3 - Cornu Ammonis područja hipokampusa 1 i 3

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

DG - nazubljena vijuga hipokampusa (engl. *dentate gyrus*)

GLUT - transporter za glukozu (engl. *glucose transporter*)

GPI - glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

HRP - peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

IR - inzulinski receptor

IR- α - alfa podjedinica receptora za inzulin

IRS - supstrati inzulinskog receptora

PBS - fosfatni pufer (engl.. *phosphate-buffered saline*)

PFA - paraformaldehid

St3Gal5 - sinteza gangliozida GM3 (engl. *ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase*)

Sur. - suradnici

T1DM - diabetes mellitus tip 1

T2DM - diabetes mellitus tip 2

1. UVOD

1.1. Hipokampus

Hipokampus je dio mozga zadužen za stvaranje dugoročnog pamćenja te za snalaženje u prostoru. (1) Pripada limbičkom sustavu koji kontrolira emocionalno ponašanje i motivacijske nagone (2). Smješten je na ventromedijalnoj površini temporalnog režnja mozga (1). Kod zdravog odraslog čovjeka duljine je 40-45 mm te se dijeli na tri dijela: prednji dio ili glava, srednji dio ili tijelo i stražnji dio ili rep (3).

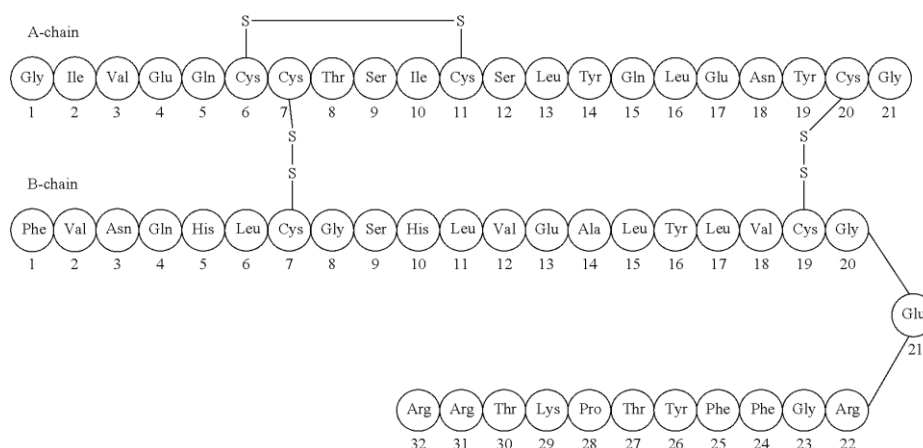
Ozljeda hipokampusa dovodi do nemogućnosti učenja novih informacija. Ta pojava u kojoj osoba može zapamtiti samo ono što se trenutno zbiva, ali nije u mogućnosti uspostaviti pamćenja duža od nekoliko minuta, naziva se anterogradna amnezija (1). Razne studije pokazale su da su strukture medijalnog, temporalnog režnja mozga nužne za stvaranje deklarativnog pamćenja te za pamćenje događaja i predmeta u vremenu i prostoru (2). Osim navedenih uloga, hipokampus je, uz olfaktorne bulbose i nedavno otkriveno područje u hipotalamusu (4, 5), jedno od rijetkih mjesta u odraslom mozgu u kojem dolazi do stvaranja novih živčanih stanica središnjeg živčanog sustava (2).

Hipokampus se sastoji od nekoliko vrsta neurona. Granularni neuroni smješteni su u nazubljenoj vijugi (engl. *dentate gyrus*, DG), a piramidalni neuroni u tzv. *Cornu Ammonis* (CA) područjima 1, 2 i 3. Za stvaranje dugoročnog pamćenja odgovorne su mreže između tih stanica, a jedna od njih je i trisinaptički put $DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$ koji povezuje hipokampus s ostatkom kore velikog mozga (3).

Nizom istraživanja utvrđeno je kako, s obzirom da hipokampus sadrži o inzulinu osjetljiv GLUT4 transporter glukoze, je za normalno odvijanje navedenih procesa hipokampusu neophodan inzulin (6).

1.2. Inzulin

Inzulin je peptidni hormon, molekularne mase oko 6 kDa, koji se sastoji od 51 aminokiseline. Izravno u krv luče ga β stanice Langerhansovih otočića. Građen je od dva polipeptidna lanca koja su međusobno povezana disulfidnim vezama (Slika 1). Odvajanjem A i B lanaca molekula inzulina gubi svoju biološku aktivnost (7).



Slika 1. Struktura inzulina. Crte označavaju disulfidne mostove. (Slika preuzeta iz rada autora Steven G. Ayre MD (8) i prilagođena).

Sinteza inzulina odvija se u β -stanicama gušterače, a započinje prenošenjem RNA na ribosome u hrapavom endoplazmatskom retikulu (7). Na taj način stvara se preproinzulin molekularne mase oko 11,5 kDa. Nakon toga, djelovanjem mikrosomalnih oksidaza, stvara se proinzulin molekularne mase oko 9 kDa koji je sastavljen od A i B-lanca spojenih sa C-lancem. Najvećim dijelom proinzulin nastavlja razgradnju u Golgijevu aparatu te na taj način nastaje aktivni inzulin koji je sastavljen od A i B-lanca spojenih disulfidnim vezama i neaktivni C-peptid. Oni se u portalni krvotok otpuštaju egzocitozom koju reguliraju glukoza, glukagon i acetilkolin. Razgradnja inzulina odvija se u jetri redukcijom disulfidnih veza, a ostatak u bubregu gdje se također razgrađuje i biološki neaktivni C-peptid (7).

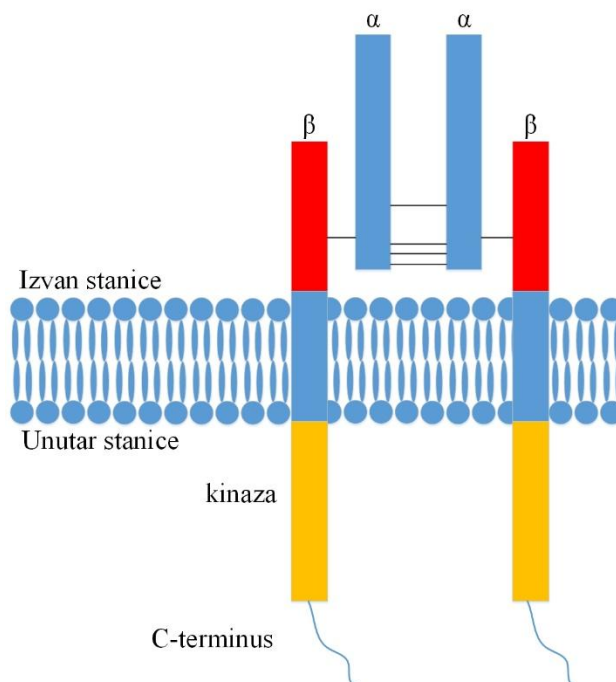
U suradnji s glukagonom ovaj hormon zadužen je za održavanje stalne koncentracije glukoze u krvi. Inzulin smanjuje njezinu razinu, dok glukagon djeluje suprotno povećavajući koncentraciju glukoze u krvi (1). Osim što pospješuje iskorištavanje ugljikohidrata za dobivanje energije, inzulin koči iskorištavanje masti. Odnosno, kada je koncentracija glukoze smanjena, prestaje izlučivanje inzulina te se za dobivanje energije upotrebljavaju masti, dok je pri visokoj koncentraciji glukoze situacija obrnuta pa se tako povećava lučenje inzulina i umjesto masti, za dobivanje energije, upotrebljavaju ugljikohidrati (1).

Poremećaji u lučenju inzulina mogu dovesti do razvoja inzulinske rezistencije ili dijabetesa. Razlikujemo dva tipa šećerne bolesti. Tip 1 šećerne bolesti (*Diabetes mellitus* tip 1, T1DM) je autoimuno oboljenje koje se najčešće pojavljuje u djetinjstvu. U njemu dolazi do razaranja β stanica gušterače što dovodi do hiperglikemije i hipoinzulinemije, a normoglikemija se postiže terapijom inzulinom. Tip 2 šećerne bolesti (*Diabetes mellitus* tip 2,

T2DM) najčešće se pojavljuje kod odraslih. U T2DM dolazi do hiperglikemije i hiperinzulinemije, a za razliku od T1DM, za postizanje normoglikemije, bolesnicima ne pomaže inzulin (5). Također je, za tip 2 šećerne bolesti, karakteristična pojava komplikacija kao što su kardiovaskularni poremećaji, retinopatije i nefropatije (9).

1.2.1. Inzulinski receptor

U mozgu, kao i na periferiji, inzulin svoju funkciju ostvaraje preko receptora koji pripadaju porodici protein-tirozin kinaza (1). Vezanjem za svoj receptor, inzulin potiče stanice na ugradnju transportera glukoze (GLUT) povećavajući na taj način unos glukoze u stanice (10). Inzulinski receptori su građeni kao heterotetrameri od dvije izvanstanične α -podjedinice i dvije transmembranske β -podjedinice povezane disulfidnim vezama (Slika 2). Inzulin se veže na α -podjedinice izvan stanice što dovodi do konformacijskih promjena i autofosforilacije dijela β -podjedinica te se tako aktivira podjedinica tirozin-kinaze. Ona zatim uzrokuje fosforilaciju brojnih intracelularnih enzima među kojima i skupinu nazvanu supstrati inzulinskog receptora (IRS). Različite vrste IRS-a u različitim tkivima rezultiraju aktivacijom i inaktivacijom različitih enzima. Ovim mehanizmom inzulin upravlja unutarstaničnim metabolizmom i daje željeni učinak na metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina (1).



Slika 2. Inzulinski receptor. (Slika izrađena prema shemi iz rada autora McKern (11)).

Dugo vremena mozak je smatran neosjetljivim na inzulin, no brojna istraživanja dokazala su upravo suprotno. Dokazana je bitna uloga ovog hormona u kontroli energetskeg

statusa organizma. Tako je primjerice pokazano da je količina inzulina u krvi razmjerna količini masnog tkiva (12).

1.3. Stanična membrana i lipidne splavi

Stanična membrana se sastoji od glikolipida, kolesterola i četiri vrste fosfolipida (fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i sfingomijelina) (13). Temeljna joj je struktura fosfolipidni dvosloj kojeg tvore molekule fosfolipida sastavljene od jedne hidrofilne glave i dva hidrofobna repa. Polarni dijelovi nalaze se na vanjskoj strani membrane dok se nepolarni nalaze u unutrašnjosti. U dvosloj fosfolipida ugrađuje se kolesterol tako da mu je hidrofilna skupina smještena uz glave fosfolipida dok su glikolipidi smješteni samo na vanjskom sloju membrane tako da im je ugljikohidratni dio okrenut prema staničnoj površini (13).

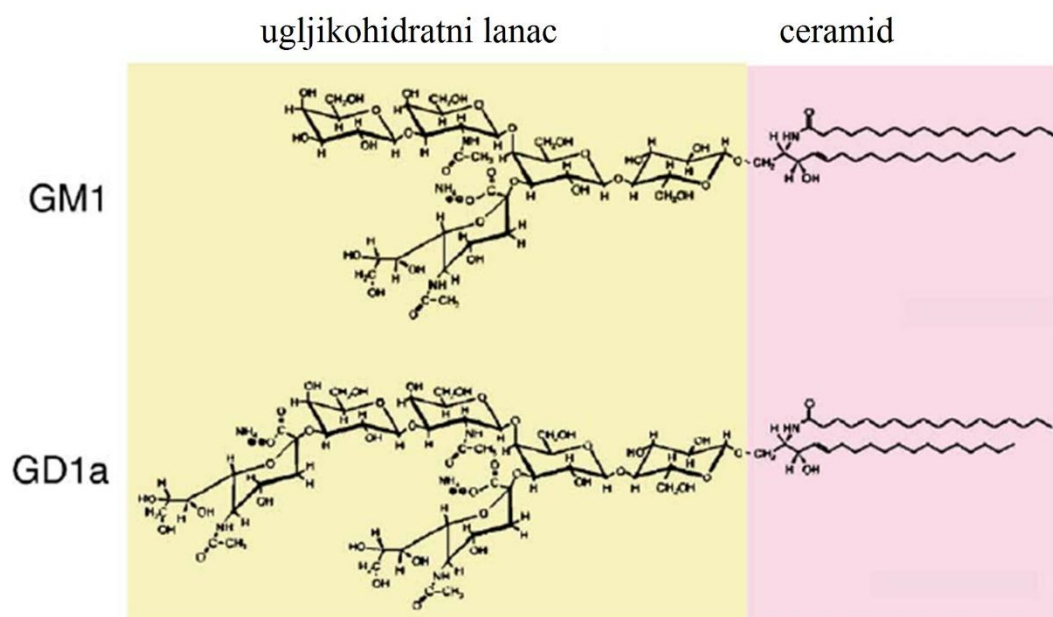
Međutim, stanična membrana nije u svim svojim dijelovima jednako građena. Interakcijom sfingomijelina, glikolipida i kolesterola nastaju domene poznate kao lipidne splavi (engl. *lipid rafts*) (13). Ovi dijelovi membrane su visokouređeni i manje fluidniji od ostatka fosfolipidnog dvosloja. Uz kolesterol, sfingomijelin i gangliozide koji grade vanjski sloj splavi te kolesterol i fosfolipide koji grade unutarnji sloj, lipidne splavi sadržavaju još i proteine s glikozilfosfatidilinozitolnim sidrom (GPI). S obzirom na takav sastav lipida može doći do narušavanja slobodne difuzije membranskih proteina, odnosno ulaska pojedinih vrsta membranskih proteina u splavi ili iz splavi. Na ovaj način nakupljaju se proteini tijekom staničnog pokretanja ili signalizacije u signalosome (13). Periferni membranski proteini poput kaveolina, vezanjem s citoskeletom, omogućuju stabilizaciju lipidnih splavi (13). Trenutno su poznate tri različite izoforme kaveolina. Kaveolin-1 i kaveolin-2 nalaze se na adipocitima, fibroblastima, pneumocitima, astrocitima, neuronima te u stanicama epitela i endotela, dok se kaveolin-3 nalazi u svim vrstama mišićnog tkiva. Ovaj protein potiče staničnu membranu na uvijanje te na taj način nastaju podvrste lipidnih splavi poznate kao kaveole (14). Nizom istraživanja dokazana je uloga kaveola u procesu signalne transdukcije, endocitoze, usmjeravanju aksona, ostvarivanju stanične adhezije, sinaptičkom prijenosu signala i proteolizi vezanoj uz membranu (15, 16).

Inzulinski receptor (IR) je u perifernim tkivima smješten u lipidnim splavima, odnosno kaveolama, te se stoga smatra da je situacija ista i u mozgu (14, 17). Osim s kaveolinom, receptori ostvaruju veze s gangliozidima koji također imaju ulogu u signalizaciji putem

receptora. Osjetljivost inzulinskog receptora može se regulirati izravnim lateralnim interakcijama s gangliozidima u staničnoj membrani (18).

1.4. Gangliozidi

Gangliozidi su glikosfingolipidi koji imaju važnu ulogu u formiranju lipidnih splavi. Građeni su od ceramida i polarnog ugljikohidratnog lanca, a od ostalih glikosfingolipida razlikuju se jer u molekuli sadrže jednu ili više sijalinskih kiselina (19). S obzirom na njihov smještaj (lipidni dio u vanjskom sloju membrane, a šećerni dio koji je slobodan u izvanstaničnom prostoru) imaju sposobnost stvaranja međumolekularnih interakcija (20). Lateralne interakcije (cis) stvaraju se unutar iste membrane te na taj način reguliraju odgovor signalnih proteina. Osim u cis interakcijama, gangliozidi sudjeluju i u trans interakcijama s proteinima na susjednim membranama. Posljedica ovih interakcija je stanično prepoznavanje (21).



Slika 3. Struktura gangliozida GM1 i GD1a (Slika preuzeta iz rada autora Saslowsky DE (22) i prilagođena)

S obzirom na kompleksnost nomenklature gangliozida, razvijeno je imenovanje kratkom nomenklaturom prema Svennerholmu. Velikim slovom G označava se ganglio serija, zatim slijedi broj sijalinskih kiselina koji se označava slovima M (mono), D (di), T (tri), Q (tetra) i P (penta) te na kraju broj šećernih ostataka u molekuli. On se dobiva tako da se stvarni broj šećera u lancu oduzme od broja 5. Broj sijalinskih kiselina vezanih na unutrašnju galaktozu i metabolički put nastanka označavaju se malim slovom (a-jedan, b-dva, c-tri) (20).

Do sada je otkriveno preko stotinu vrsta ovih molekula s obzirom na različitosti u dužini i zasićenosti njihovih glikana i ceramida (20). Gangliozidi količinski dominiraju u mozgu iako su prisutni u svim tkivima kralježnjaka. U mozgu viših kralježnjaka dominiraju četiri vrste gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (23). Njihova funkcija još uvijek nije u potpunosti definirana, ali je poznato da GM1 sudjeluje u ranoj mijelinizaciji, GD1a je marker sinaptogeneze, a GT1b je karakterističan za zrele neurone (24). Nadalje, stupanjem u brojne interakcije s raznim molekulama i receptorima gangliozidi reguliraju stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (25).

1.4.1. Sinteza i razgradnja gangliozida

Dodavanjem glukoze na ceramid započinje postupna sinteza gangliozida (26). Vezanjem galaktoze, sijalinske kiseline i N-acetilgalaktozamina nastaju različiti oblici gangliozida. Tako izgrađeni osnovni šećerni lanac gangliozida ima strukturu: Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcCer. Najvažniji dio sinteze je dodavanje sijalinske kiseline i/ili N-acetilgalaktozamina na ugljikohidratni lanac. U slučaju dodavanja N-acetilgalaktozamina, sijalinska kiselina se ne može vezati te se na taj način određuje kojoj će seriji gangliozidi pripadati: 0-bez sijalinske kiseline na unutrašnjoj galaktozi, a-jedna sijalinska kiselina, b-dvije sijalinske kiseline, c-tri ili više sijalinskih kiseline. Sijalinska kiselina daje negativan naboj i kiseli karakter (27).

Kod zdrave osobe razgradnja gangliozida odvija se u liposomima gdje dolazi do odgrađivanja terminalnih šećera. Nemogućnost razgradnje gangliozida dovodi do Tay-Sachsove bolesti. Budući da su liposomi neurona ispunjeni lipidima, u ovoj bolesti dolazi do oticanja neurona zbog čega bolesna djeca pokazuju slabost i retardaciju prije navršene prve godine života, demenciju i sljepoću prije druge godine života, a prije treće najčešće dolazi do smrti. Ova bolest dijagnosticira se još u vrijeme razvoja ploda, a kod novorođenčadi je bitno povećana koncentracija gangliozida u mozgu. Osobito je povećan sadržaj gangliozida GM2 jer se N-acetilgalaktozaminski ostatak teško ili nikako ne uklanja, a β -N-acetilheksozaminidaza je enzim koji je u smanjenim količinama ili potpuno izostaje (28).

2. HIPOTEZA

Ekspresija inzulinskog receptora u hipokampusu, kod genetički izmjenjenog miša *B4Galnt1* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida, bit će promijenjena.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- odrediti ekspresiju inzulinskog receptora u hipokampusu divljeg tipa miša i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida
- utvrditi kako nedostatak kompleksnih gangliozida utječe na ekspresiju inzulinskih receptora te njihovu signalizaciju u dijelu mozga koji je povezan s dugoročnim pamćenjem i emocijama

4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu projekata *Promjene u sastavu gangliozida utječu na promjene u sastavu lipidnih splavi glia stanica što dovodi do fenotipskih promjena i progresije tumora* (VIF2016-MEFOS-39) te *Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi* (IP-09-2014-2324). Za rad s navedenim životinjama koje su nabavljene u sklopu projekta *Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi* (IP-09-2014-2324) dobiveno je dopuštenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.1. Materijali

U svrhu istraživanja korišteno je tkivo mozga divljeg tipa miša (engl. *wild type*, WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1*. Genetički izmijenjeni miševi stari su tri mjeseca te imaju nedostatak u sintezi kompleksnih gangliozida. Za izradu rada korištena su tri miša divljeg tipa i tri genetički izmijenjena miša.

4.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- SYBR Safe (Invitrogen, , Carlsbad CA, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, Germany)
- agaroza
- TBE pufer
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- PBS:
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
 - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
 - Na₂HPO₄x7H₂O (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA),
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- 2-metilbutan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- 30% vodikov peroksid (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)
- primarno protutijelo: anti-IR- α , zečji poliklonalni IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD, SC-710)
- sekundarno protutijelo: kozje anti-zečje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- tercijarni kompleks “*Vectastain ABC Kit Elite*” koji sadrži kompleks avidina i biotiniziranog HRP-a (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- diaminobenzidin (DAB) (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)
- Vectamount pokrivalo (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)

4.3. Metode

4.3.1. Genotipizacija

Za genotipizaciju miševa uzimani su uzorci repova. Izolacija DNA napravljena je korištenjem visokih koncentracija NaOH (50 mM). NaOH je dodan izravno na uzorke tkiva koji su inkubirani na 95°C 30 minuta. Zatim je NaOH otpipetiran, a na izoliranu DNA dodan je AE pufer. Kako bi utvrdili koji su miševi divljeg tipa, a koji su genetički modificirani, korištena je metoda lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) te su umnoženi kratki odsječci DNA korištenjem specifičnih početnica. Korištene oligonukleotidne početnice su 3' Neo (null AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC), 5' Neo (null CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC) te WT sense (TGC CTC AGC CAA CAG CTT CC) i WT antisense (CGC CCT ATC GAA ACA CAC AGG). Elektroforezom u agaroznom gelu, u koji je dodana boja *Syber Safe*, su razdvojeni segmenti DNA i vizualizirani pod UV svjetlom.

4.3.2. Žrtvovanje životinja

Životinje su anestetizirane izofluranom nakon čega je napravljena transkardijalna perfuzija. Perfuzija je napravljena u trenutku duboke anestezije tako da je uvedena igla u lijevu klijetku srca, a desna pretklijetka je prerezana škarama. 1xPBS-om je polagano isprana krv iz organizma miša, a kao indikator gledana je jetra koja je blijedila. U isto područje lijeve klijetke uvedena je igla s fiksativom (4% paraformaldehid). Pokazatelj uspješne fiksacije je grčenje mišića i po završetku perfuzije potpuna ukočenosti tijela. Izolirani mozak fiksiran je 24 sata u 4% PFA na +4°C. Sljedeći korak je krioprotekcija u 10 i 20 postotnoj saharozi, a nakon toga smrzavanje uzoraka u pothlađenom izopentanu i spremanje na -80°C do analize. Za rezanje tkiva mozga korišten je kriostat (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany)

pri temperaturama CT -18°C i OT -16°C. Mozgovi su rezani u koronarnom smjeru debljine 35 µm te su prikupljani u 1xPBS.

4.3.3. Imunohistokemija

Imunohistokemija je započeta tretiranjem rezova jednopostotnim vodikovim peroksidom u 1xPBS-u kako bi došlo do zasićenja endogenih peroksidaza. Sljedeći korak je blokiranje nespecifičnih reakcija u otopini za blokiranje koja se sastoji od 1% goveđeg seruma i 5% kozjeg seruma u 1xPBS-u. Potom su rezovi inkubirani u primarnom protutijelu tijekom dvije noći na +4 °C na tresilici. Primarno protutijelo za alfa podjedinicu inzulinskog receptora (IR-α) pripremljeno je u razrjeđenju 1:250 u otopini za blokiranje nespecifičnih reakcija, tzv. blokingu. Rezovi su zatim isprani u 1xPBS-u i inkubirani u biotiniliranom kozjem anti-zečjem IgG sekundarnom protutijelu dva sata na sobnoj temperaturi uz neprekidno treskanje. Nakon tri ispiranja u 1xPBS-u slijedila je inkubacija u tercijarnom protutijelu (kompleks avidin-biotin konjugiran s HRP-om) jedan sat. Rezovi su isprani tri puta u 1xPBS-u i vizualizirani pomoću supstrata diaminobenzidina (DAB) do pojave obojenja, a premještanjem u 1xPBS zaustavljena je reakcija DAB-a i HRP-a. Na silanizirana predmetna stakalca navučeni su rezovi i prekriveni Vectamount pokrivalom te pokrovnim stakalcem.

4.3.4. Analiza izražaja IR-α

Nakon imunohistokemije preparati su mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) te slikani kamerom *Olympus DP70* (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) koja je montirana na mikroskop. Preparati su slikani pod povećanjem 400x na slikovnom području veličine 200x200 µm. Nakon slikanja, slike su analizirane u računalnom programu *ImageJ (Fiji 101)* prema prethodno opisanom protokolu (29), a statistika je napravljena u programu *Statistica 12* (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene su Mann-Whitney-U testom. Razina značajnosti je 0,05.

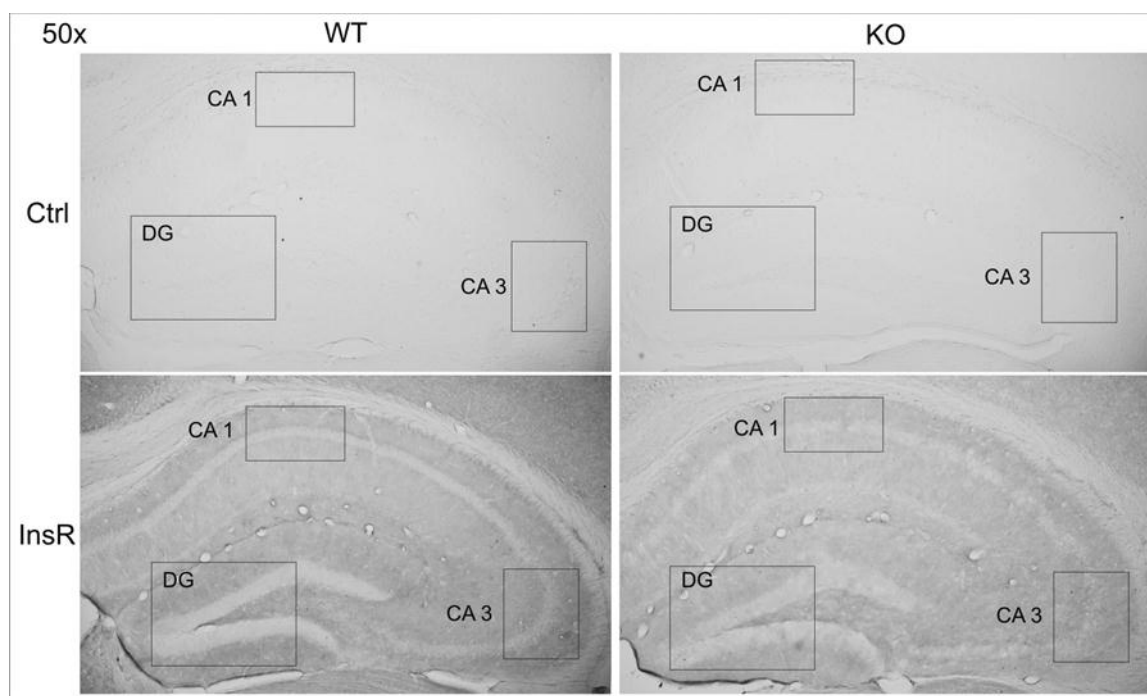
5. REZULTATI

Distribucija inzulinskog receptora istražena je na tri regije hipokampusa koji je zadužen za stvaranje dugoročnog pamćenja i emocije. U programu *Fiji* analizirane su slike iz obje hemisfere mozga te je određena količina piksela koja odgovara količini pozitivnog obojenja protutijelom IR- α . Rezultati su prikazani posebno za svaku regiju (Tablica 1), a u programu *Statistica 12* rezultati su statistički obrađeni.

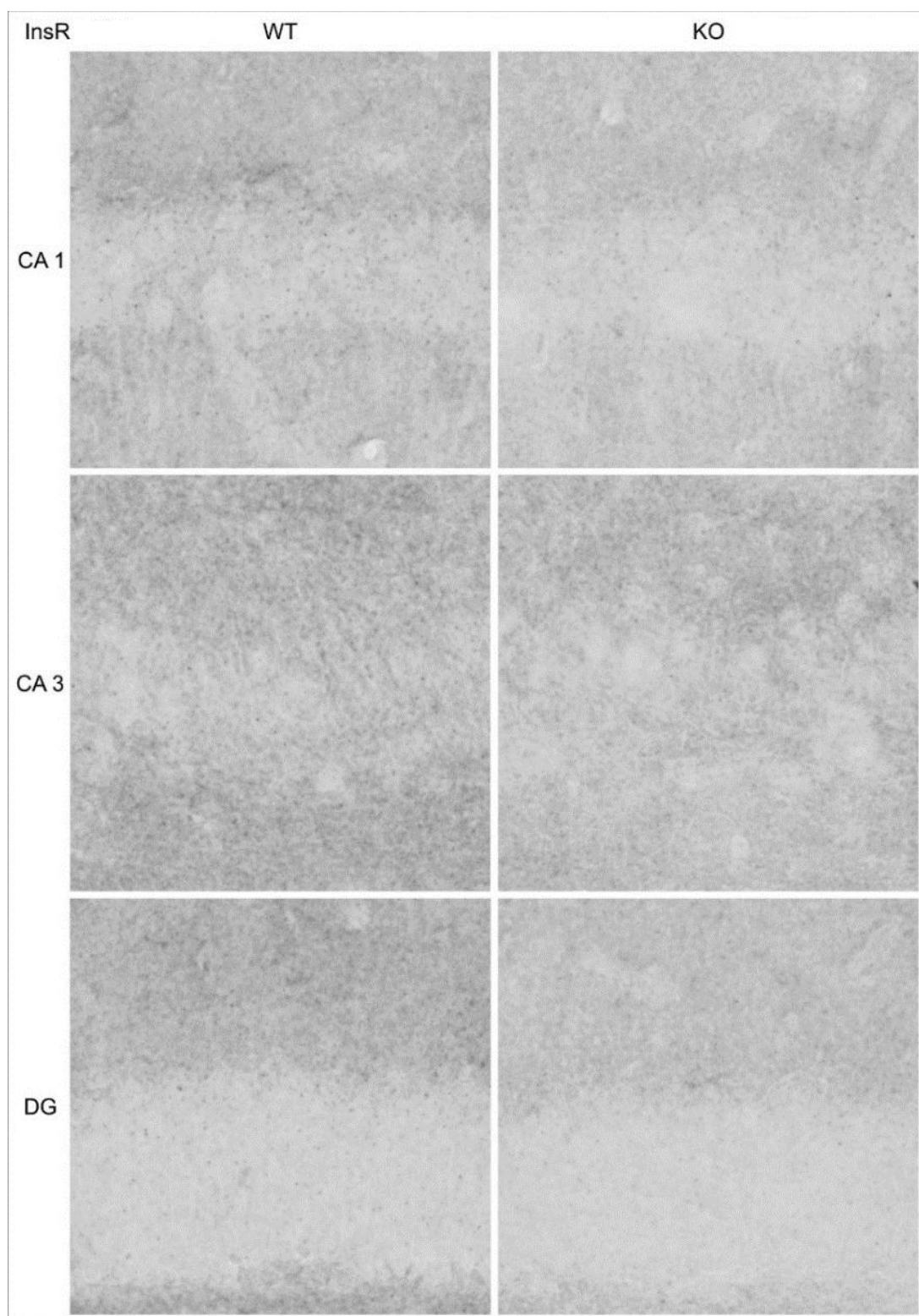
Tablica 1. Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelom IR- α u područjima hipokampusa CA1, CA3 i DG.

Analizirano područje	Miš	Srednja vrijednost količine piksela
CA1	KO	489,92125
	WT	311,04477
CA3	KO	15311,20895
	WT	235871,05750
DG	KO	79,46950
	WT	4724,07998

Nespecifičnih vezanja protutijela nije bilo što pokazuju kontrolni rezovi koji su imunonegativni. Pod povećanjem 50x napravljene su slike cijelog hipokampusa na kojima su vidljive promjene u ovim područjima, osobito u CA3 regiji (Slika 4) te pod većim povećanjem od 400x zasebno za svaku od tri regije hipokampusa koje jasno pokazuju kako je kod genetički izmijenjenih miševa *B4Galnt1* došlo do smanjenja u ekspresiji IR- α (Slika 5).



Slika 4. Prikaz analiziranih regija u hipokampusu miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO). CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja 1 i 3 i DG (engl. *dentate gyrus*) - nazubljena vijuga hipokampusa. Povećanje je 50x.

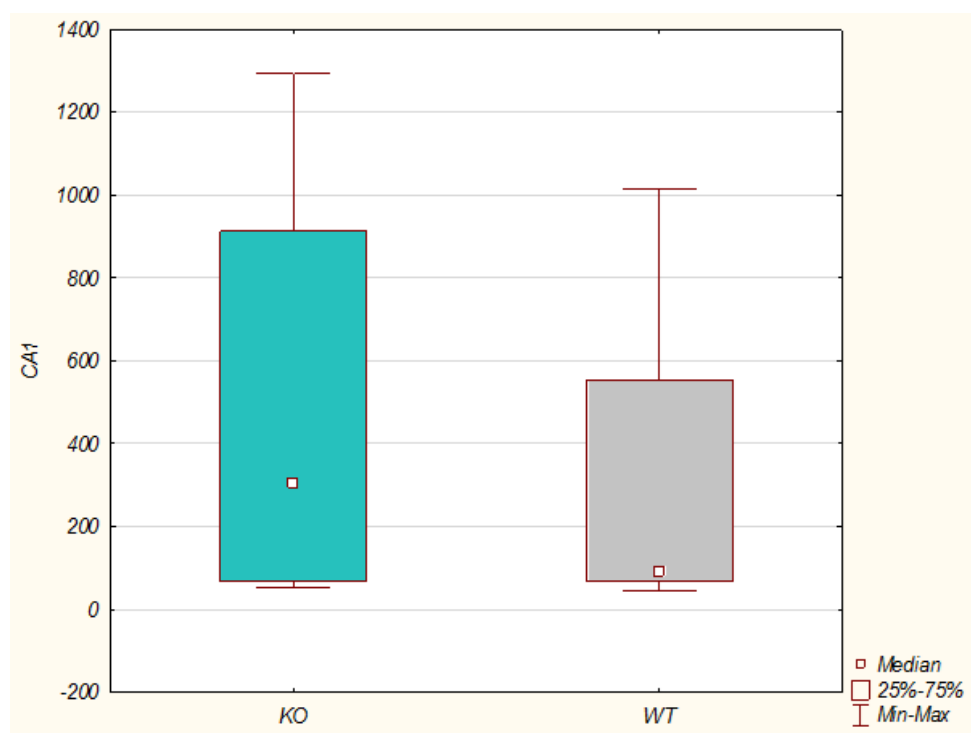


Slika 5. Imunohistokemijsko obojenje inzulinskog receptora u tri regije hipokampusa (CA1, CA3 i DG) kod miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO). CA1 i CA3 - *Cornu Ammonis* područja 1 i 3 i DG (engl. *dentate gyrus*) - nazubljena vijuga hipokampusa. Povećanje je 400x.

Analizom je utvrđeno da je inzulinski receptor izražen u sva tri istraživana područja, ali u različitoj mjeri. Statistički značajna razlika u distribuciji IR- α uočena je u područjima CA3 ($p=0,030384$, $Me=87371,47$, $Min=6815,840$, $Max=296086,2$) i DG ($p=0,030384$, $Me=622,47$, $Min=7,110$, $Max=15631,1$) dok u CA1 regiji razlika u distribuciji kod WT i KO nije značajna ($p=0,885234$, $Me=92,48$, $Min=46,050$, $Max=1294,0$).

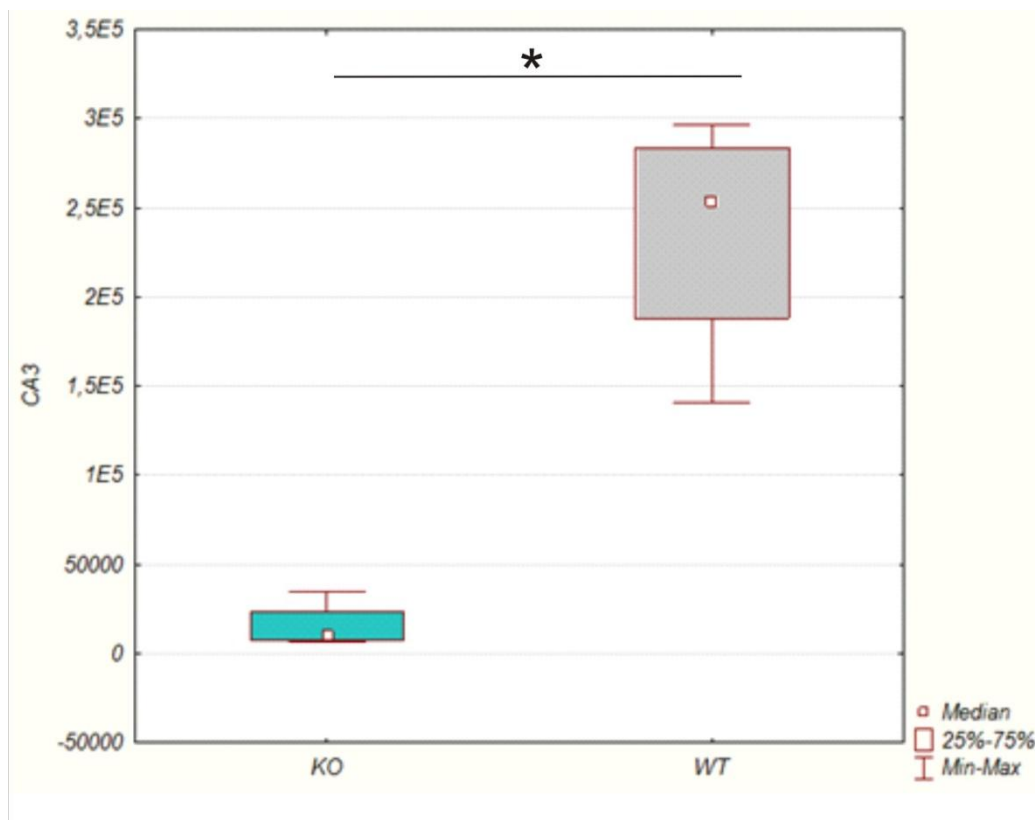
Najveća ekspresija IR- α zabilježena je u CA3 regiji, a iznosila je 296086,2 piksela, dok je u DG zabilježena najmanja ekspresija koja je iznosila 7,110 piksela. Najmanji medijan je u CA1 regiji (92,48) gdje je i maksimum ekspresije bio najmanji (1294,0).

U CA1 regiji na temelju statističke obrade nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju IR- α kod genetički izmijenjenog miša u odnosu na divlji tip miša (Slika 6.).



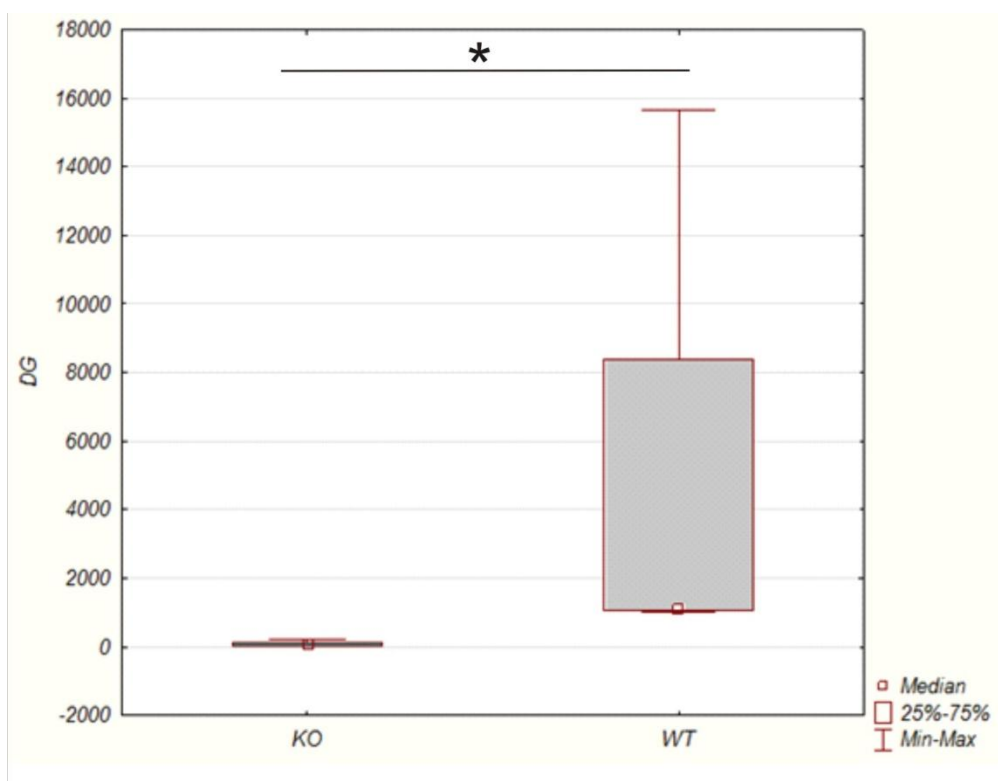
Slika 6. Usporedba ekspresije IR- α kod miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO) u CA1 području hipokampusa.

U CA3 regiji hipokampusa, kod genetički izmijenjenog miša, smanjenje izražaja IR- α je statistički značajno (Slika 7).



Slika 7. Usporedba ekspresije IR- α kod miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO) u CA3 području hipokampusa. * označava statistički značajnu razliku, $p=0,030384$

Kao i u CA3 regiji, u DG postoji statistički značajna razlika u ekspresiji IR- α kod genetički izmijenjenih miševa u odnosu na divlje tipove, iako je ekspresija u ovom dijelu hipokampusa znatno manja, nego u CA3 području (Slika 8).



Slika 8. Usporedba ekspresije IR- α kod miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* (KO) u DG području hipokampusa. * označava statistički značajnu razliku, $p=0,030384$

6. RASPRAVA

Diabetes mellitus je kronična bolest koja trenutno predstavlja značajan javnozdravstveni problem u svijetu budući da ju prate brojne komplikacije kao što su kardiovaskularni poremećaji, retinopatije, nefropatije pa čak i Alzheimerova bolest (5, 9). Do šećerne bolesti dolazi zbog povišene koncentracije glukoze u krvi koja nastaje kao posljedica poremećaja u lučenju inzulina. Kako bi inzulin mogao regulirati razinu glukoze u krvi, potrebno je ispravno funkcioniranje njegova receptora (1). Inzulinski receptor perifernih tkiva smješten je u lipidnim splavima koje formiraju gangliozidi. Gangliozidi stupaju u interakcije s drugim receptorima i transmembranskim proteinima te na taj način reguliraju stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Također su važni i za međustanične interakcije te interakcije između stanica i izvanstaničnog matriksa ili drugih molekula. Budući da je inzulinski receptor okružen gangliozidima već u Golgijevu aparatu, te zajedno s njim izlazi na membranu, poremećaji u sintezi gangliozida dovode i do promjena u izražaju inzulinskog receptora te u inzulinskoj signalizaciji (25).

U istraživanju su korišteni miševi divljeg tipa te genetički izmijenjeni miševi *B4Galnt1* s poremećajem u sintezi kompleksnih gangliozida. Proučavana je ekspresija IR- α u hipokampusu čija je uloga stvaranje dugoročnog pamćenja te snalaženje u prostoru. Hipokampus je također i jedno od rijetkih mjesta u odraslom mozgu u kojem se stvaraju novi neuroni (1, 4, 5). Upravo te funkcije čine ga zanimljivim za istraživanje distribucije inzulinskog receptora budući da on svoju ulogu ne može ostvariti bez inzulina (6).

U radu su proučavane tri regije hipokampusa (CA1, CA3 i DG) kod divljeg tipa miša i genetički izmijenjenog miša. U DG smješteni su granularni neuroni, dok su piramidalni neuroni u CA područjima 1, 2 i 3. Za stvaranje dugoročnog pamćenja odgovorne su mreže između granularnih i piramidalnih neurona (3). Najveći izražaj inzulinskog receptora pronađen je u CA3 regiji, što je bilo i očekivano budući da su dosadašnja istraživanja koja su, između ostalog, rađena na štakorima pokazala najveći izražaj inzulinskog receptora upravo u ovoj regiji hipokampusa (29). Ostale regije također su pokazale izražaj, ali u manjoj mjeri. Kod *B4Galnt1* miša došlo je do smanjenja u ekspresiji koja je statistički značajna u CA3 i DG regijama dok u CA1 regiji razlika nije statistički značajna. U CA3 regiji i DG u kojima dolazi do smanjenja u izražaju IR- α posljedično može doći do rezistencije na inzulin. Istraživanja na miševima *St3Gal5* s nedostatkom u ekspresiji gangliozida GM3 pokazala su kako do promjena u toleranciji na glukozu dolazi zbog poremećaja u formiranju lipidnih splavi (30). Osim toga, druga skupina istraživača zaključila je kako je nenormalna produkcija gangliozida

GM3 povezana s pretilošću, i s njom povezanim, razvojem inzulinske rezistencije i šećerne bolesti (31).

S obzirom da isključenje gena za sintezu kompleksnih gangliozida dovodi do smanjenja izražaja inzulinskog receptora, inzulinski put je manje aktivan i manja količina glukoze ima priliku ući u stanice. Za očekivati je da smanjeni izražaj IR narušava dugoročno pamćenje te ometa normalnu proizvodnju novih neurona kod odraslog čovjeka (adultnu neurogenezu). Sukladno tome, dokazano je kako smanjena inzulinska ekspresija dovodi i do razvoja Alzheimerove bolesti (32). Veza između defekta u sintezi gangliozida i promjena u funkcioniranju inzulinskog receptora pokazuju kako Alzheimerova bolest ne mora nužno biti posljedica mutacije ili epigenetskih promjena do sada opisanih gena (APP, APOE, PSEN2) (33).

Nedavna istraživanja pokazala su kako i prehrana bogata ugljikohidratima i mastima utječe na distribuciju IR- α u pojedinim regijama hipokampusa, odnosno da režim prehrane utječe na sastav membrana, a tako i na funkciju receptora koji zahtijevaju određeni lipidni okoliš (29).

Promjena ekspresije gangliozida analizirana je u prethodnim istraživanjima u masnom tkivu. Pokazalo se kako smanjenje njihove ekspresije dovodi do smanjenja osjetljivosti inzulinskog receptora (34).

Ograničenje naše studije je broj i starost životinja koje su nam bile na raspolaganju. U nekoj narednoj studiji istraživanje bi trebalo napraviti na starijim životinjama jer je kod njih fenotip izraženiji. Također životinje treba hraniti masnom hranom kako bi se ranije isprovocirao fenotip.

Zaključujemo kako promjene sastava lipida stanične membrane pospješuju razvoj inzulinske rezistencije u mozgu i potencijalno dovode do Alzheimerove bolesti.

7. ZAKLJUČCI

- Poremećaji u sintezi kompleksnih gangliozida, izazvani isključenjem gena *B4Galnt1*, dovode do smanjenja u ekspresiji IR- α u svim istraživanim regijama hipokampusa (CA1, CA3, DG).
- Najveći izražaj IR- α zamijećen je u CA3 području genetički modificiranih i kontrolnih miševa.
- Smanjenje ekspresije IR- α u miševa s isključenim genom *B4Galnt1* potencijalni je znak razvoja inzulinske rezistencije i posljedično neurodegeneracije.

8. SAŽETAK

Uvod: Hipokampus je dio mozga odgovoran za dugoročno pamćenje i emocije, a za ostvarivanje funkcija neophodan mu je inzulin. Inzulin, zajedno s leptinom, regulira energijski metabolizam organizma. Svoje djelovanje ostvaruje preko receptora za koje je pokazano da je u periferiji smješten u lipidnim splavima, visoko uređenim domenama na membrani, čiji su glavni organizatori gangliozidi.

Ciljevi: Odrediti ekspresiju inzulinskog receptora u hipokampusu genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* s poremećajem u sintezi kompleksnih gangliozida.

Materijali i metode: Za istraživanje su korišteni miševi divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjeni miševi (KO). Nakon utvrđenog genotipa, životinje su žrtvovane, a mozgovi su izolirani, fiksirani i krioprotektirani. Kako bi se utvrdila distribucija inzulinskog receptora α podjedinice, napravljena je imunohistokemijska analiza tkiva hipokampusa korištenjem visokospecifičnog protutijela IR- α na kriostatskim rezovima debljine 35 μ m metodom slobodno-plutajućih rezova. Dobiveni rezultati analizirani su korištenjem svjetlosnog mikroskopa te slikani kamerom, a dobivene slike su analizirane u programu *Fiji*. Statistika je napravljena u programu *Statistica 12*.

Rezultati: Najveća ekspresija IR- α uočena je u CA3 području hipokampusa oba istraživana miša. U genetički izmijenjenom mišu distribucija je smanjena u sva tri područja u odnosu na kontrolnog miša. Ta razlika je u CA3 i DG području statistički značajna dok u CA1 razlika postoji, ali nije statistički značajna.

Zaključak: Kompleksni gangliozidi imaju važnu ulogu u formiranju lipidnog okruženja inzulinskog receptora u hipokampusu. Korištenjem genetički izmijenjenog miša *B4Galnt1* s poremećajem u sintezi kompleksnih gangliozida pokazano je kako se ekspresija inzulinskog receptora smanjuje.

Ključne riječi: gangliozidi; genetički izmijenjeni miševi; hipokampus; inzulinski receptor; lipidne splavi

9. SUMMARY

Distribution of insulin receptor in the hippocampus of genetically modified mouse *B4Galnt1*

Introduction: Hippocampus is the part of the brain responsible for long term memory and emotions and it needs insulin for its unhindered function. Insulin, together with leptin, regulates the energy metabolism of the organism. Its activity is realized through receptors that have been shown to be located in the peripheral lipid rafts, highly regulated membrane domains, whose main organizers are gangliosides.

Goals: To determine the expression of insulin receptor in hippocampus of the genetically modified *B4Galnt1* mouse with disorder in the synthesis of the complex gangliosides.

Materials and methods: Wild type mice (WT) and genetically modified mice (KO) were included in the research. First, the genotype was determined, then the animals were sacrificed, and the brains were isolated, fixed and cryoprotected. In order to determine the distribution of the α -subunit insulin receptor, immunohistochemical analysis of hippocampus tissue was performed using high-specific anti-IR- α on 35 μ m thick cryostat cuts by free-floating cuts method. The results were analyzed using a light microscope and were photographed by camera. The created images were analyzed in *Fiji* and the statistics were made in the *Statistics 12* program.

Results: The highest expression of IR- α was observed in the CA3 area of the hippocampus of both investigated mice. In a genetically modified mouse, the distribution was reduced in all three domains in relation to the control mouse. The difference in CA3 and DG area is statistically significant while the difference in CA1 exists but is not statistically significant.

Conclusion: Complex gangliosides play an important role in the formation of the lipid environment of the insulin receptor in the hippocampus. Using the genetically modified mouse *B4Galnt1* with a disorder in the synthesis of complex gangliosides has shown that expression of the insulin receptor decreases.

Key words: gangliosides; genetically modified mice; hippocampus; insulin receptor; lipid rafts

10. LITERATURA

1. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
2. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. Neuroznanost. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
3. Stemberger K. Hipokampus i učenje. Gyrus 2014;2:55-9.
4. Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, i sur. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. Exp Neurol 2005;192(2):251–64.
5. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Mice: Potential Role in Energy Balance. Science 2005;310(5748):679–83.
6. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur J Pharmacol. 2004;490(1–3):13–24.
7. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
8. Ayre SG. The Physiology and Clinical Pharmacology of Insulin in its Application in Insulin Potentiation Therapy. Dostupno na adresi: <http://contemporarymedicine.net/the-physiology-and-clinical-pharmacology-of-insulin-in-its-application-in-insulin-potentiation-therapy/>. Datum pristupa: 21.8.2017.
9. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. Int J Med Sci. 2014;11(11):1185–200.
10. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
11. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou M-Z, Adams TE, Lovrecz GO, i sur. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. Nature. 2006;443(7108):218-21.
12. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 2000;16(10):894–902.

13. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
14. Frühbeck G, López M, Diéguez C. Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(5):177–82.
15. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(10):a004697.
16. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 2002;25(8):412–7.
17. Pike LJ. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: An evolving story. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2005;1746(3):260–73.
18. Inokuchi J. GM3 and diabetes. *Glycoconj J.* 2014;31(3):193-7.
19. Svennerholm L. Structure and biology of cell membrane gangliosides. 43rd Nobel Symposium Stockholm. 1978;80-87.
20. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 2007; 17:1R -13R.
21. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(5):549–57.
22. Wayne IL, Saslowsky D. Raft trafficking of AB₅ subunit bacterial toxins. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2005;1746(3):314-21.
23. Avrova NF. Evolutionary approach to the analysis of structure and function of gangliosides. *Neurochem. Res.* 1985;10(11):1547-54.
24. Rösner H. Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2003;32:49-73.
25. Zhang X, Kiechle FL. Review: Glycosphingolipids in health and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2004;34(1):3–13.
26. Sandhoff K, Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358:847-61.

27. Lloyd KO, Furukawa K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconj. J* 15. 1998;15:627-36.
28. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biokemija*. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
29. Ivić V. Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku. 2017.
30. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, i sur. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(6):3445–9.
31. Lipina C, Hundal HS. Ganglioside GM3 as a gatekeeper of obesity-associated insulin resistance: Evidence and mechanisms. *FEBS Lett*. 2015;589(21):3221–7.
32. Herzer S, Meldner S, Rehder K, Gröne HJ, Nordström V. Lipid microdomain modification sustains neuronal viability in models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):103.
33. De Felice FG. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J Clin Invest*. 2013;123(2):531-9
34. Lopez PH, Aja S, Aoki K, Seldin MM, Lei X, Ronnett GV. Mice lacking sialyltransferase ST3Gal-II develop late onset obesity and insulin resistance. *Glycobiology*. 2017;27(2):129-39.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Martina Matanović

Datum i mjesto rođenja:

30.10.1995., Požega

Obrazovanje:

- 2014. - 2017. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2010. - 2014. Prirodoslovno-matematička gimnazija Požega
- 2002. - 2010. Osnovna škola Julija Kempfa u Požegi